

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

85 C 13782
DIALOG(R) File 347:JAPIO

(c) 1999 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

03630070 **Image available**

DECOMPOSITION OF ALIPHATIC CHLORINE COMPOUND USING MICROBE AND ITS MICROBE

PUB. NO.: 03-292970 [J P 3292970 A]
PUBLISHED: December 24, 1991 (19911224)
INVENTOR(s): UCHIYAMA HIROO
YAGI OSAMI
APPLICANT(s): KOKURITSU KANKIYOU KENKIYUU SHIYOCHIYOU [000000] (A Japanese Government or Municipal Agency), JP (Japan)
APPL. NO.: 02-093884 [JP 9093884]
FILED: April 11, 1990 (19900411)
INTL CLASS: [5] A62D-003/00; B01D-053/34; C02F-003/00; C02F-003/10; C02F-003/34; C12N-001/00; C12N-001/20; C12N-011/10; C12N-001/20; C12R-001/01
JAPIO CLASS: 28.9 (SANITATION -- Other); 13.1 (INORGANIC CHEMISTRY -- Processing Operations); 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.1 (SANITATION -- Sanitary Equipment); 32.1 (POLLUTION CONTROL -- Exhaust Disposal); 32.2 (POLLUTION CONTROL -- Waste Water Treatment)
JAPIO KEYWORD: R127 (CHEMISTRY -- Fixed Enzymes)
JOURNAL: Section: C, Section No. 924, Vol. 16, No. 128, Pg. 32, April 02, 1992 (19920402)

ABSTRACT

PURPOSE: To efficiently decompose a polluted decomposable matter by selecting a specified carrier to fix an aliphatic chlorine compound by use of decomposing ability of methylosinus trichosporium TSUKUBA without substantially degrading the decomposition ability thereof and use the new fixed microbe.

CONSTITUTION: A germ singly separated as a microbe belonging to methylosinus group and having decomposing power of aliphatic chlorine compound is methylosinus trichosporium TSUKUBA belonging to well-known methylosinus trichosporium. It is extremely important to select a carrier for fixing the germ body having the specificity of the carrier. This germ body can be fixed without substantially damaging the useful attribute only when agarose gel, calcium alginate gel and k-carrageenan gel are used as the carrier. The fixed germ body 1 is molded in the form of 3mm diameter bead or cube to be put into a vial 2 containing an inorganic salt medium, and in the case of decomposition of trichloroethylene, the decomposition rate is better than that obtained by free germ. Trichloroethylene is reduced by at least 90% after 14 hours by this method.

⑫ 公開特許公報(A) 平3-292970

㊦Int. Cl.⁹		識別記号	庁内整理番号	㊧公開	平成3年(1991)12月24日
A	62 D 3/00		6730-2E		
B	01 D 53/34	1 3 4 E	6816-4D		
C	02 F 3/00	G	6647-4D		
	3/10	A	6647-4D		
	3/34	Z	6816-4D		
C	12 N 1/00	R	9050-4B		
	1/20	Q	9050-4B		
	11/10	F	7236-4B		
//C	12 N 1/20	D	7236-4B		
C	12 R 1:01)		2121-4B		

審査請求 有 請求項の数 4 (全8頁)

④発明の名称 脂肪酸塩素化合物の微生物分解方法及びその微生物

②特 願 平2-93884

②出 題 平 2(1990)4月11日

②発	明	者	内	山	裕	夫	茨城県つくば市小野川16-2	環境庁国立公害研究所内				
②発	明	者	矢	木	修	身	茨城県つくば市小野川16-2					
⑦出	願	人	国	立	環	境	研		究	所	長	茨城県つくば市小野川16-2
④代	理	人	弁	理	士	加	々		美	紀	雄	外2名

明細書

1. 発明の名称

脂肪族塩素化合物の微生物分解方法及びその微生物

2. 特許請求の範囲

(1) メチロシナス (*Methylosinus*) 属に属し、脂肪族塩素化合物分解能を有する微生物を、アガロースゲル、カラギーナンゲル、及び／又はアルギン酸ゲルで固定化し、この固定化微生物を脂肪族塩素化合物又はその含有物と接触させることを特徴とする脂肪族塩素化合物の分解方法。

(2) 微生物がトリクロロエチレンを分解するメタン酸化性細菌である請求項(1)記載の方法。

(8) 微生物がメチロシナス・トリコスポリウム・TSUKUBA (微工研菌寄 No.10004) である請求項 (1) 又は (2) に記載の方法。

(4) メタン資化性であり、トリクロロエチレンを分解するメチロシナス・トリコスボリウム・TSUKUBA (微工研菌寄 No. 10004) をアガロ

ースゲル、 κ -カルギーナンゲル及び／又はアルギン酸カルシウムゲルで固定化した固定化微生物。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は特定の固定化微生物による飽和及び／又は不飽和脂肪酸塩素化合物の分解方法及びその方法に用いる新規固定化微生物に関するものである。

更に詳しくは工場からの排水又は排ガス中、
或いは土壌中等に含まれるトリクロロエチレン
のような揮発性脂肪族塩素化合物の微生物によ
る分解除去方法に関するものである。

〔従来の技術〕

工場からの排水又は排ガス、或いは土壌中には各種有機塩素化合物が混入されており、近時、環境汚染等の問題から、これらの有効な除去が注目されるようになってゐる。

殊にトリクロロエチレン (TCE) は、IC 産業等で用いられている難分解性化合物であり、

発ガン性を有し、地下水汚染物質として問題になっている。

従来、排水中或いは排ガス中から、トリクロロエチレンのような有機塩素化合物を除去するには、活性炭による吸着除去法等が行われてきたが、これらは多量の吸着剤や特別の装置及び設備を必要とするものであり、必ずしも効率的かつ経済的な除去手段とはなっていない。

一方、有機塩素系化合物の効率的かつ簡便な分解除去手段として、微生物を用いる方法もいくつか試みられ報告されている。

例えば、ロドトルラ属、クラドスポリウム属、キャンデイダ属、サッカロミセス属及びストレプトミセス属の微生物等を用いてポリクロル化されたビフェニルのような有機塩素化合物を分解除去する例（特開昭48-98085号、特開昭48-98086号、特開昭49-6188号）、及びメチロシナス属、メチロシスチス属、メチロコッカス属及びメチロバクテリウム属の細菌のようなメタン酸化性細菌を用いて、m-クロロトルエン

のようなハロゲン置換ベンゼンを分解する例（特開昭55-127196号）が報告されている。

しかしながらトリクロロエチレン及びその類縁化合物のような脂肪族塩素化合物を有効に分解除去する微生物についてはほとんど報告されておらず、わずかに本出願人による提案（特願昭63-239753号）があるのみである。

〔発明の解決しようとする課題〕

本発明は、前記特願昭63-239753号において提案した脂肪族塩素化合物の分解方法を工業的に一層有利に利用するための改善方法を提供すること、及びその方法に用いる新規な固定化微生物を提供することを目的とするものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者は、前記の出願において開示した微生物の固定化につき鋭意検討してきたが、ある種の担体が前記微生物の固定化に特に有効であることを知見し、本発明に至った。

すなわち、本発明は、

(1) メチロシナス属に属し、脂肪族塩素化合物

分解能を有する微生物を、アガロースゲル、κ-カラギーナンゲル、及び／又はアルギン酸カルシウムゲルで固定化し、この固定化微生物を脂肪族塩素化合物又はその含有物と接触させることを特徴とする脂肪族塩素化合物の分解方法、及び(2) メタン及びメタノールを唯一炭素源として生育し、トリクロロエチレンを分解するメタン酸化性菌であるメチロシナス・トリコスボリウム・TSUKUBAをアガロースゲル、κ-カラギーナンゲル及び／又はアルギン酸カルシウムゲルで固定化した固定化微生物からなるものである。

本発明の微生物自体はすでに述べたように特願昭63-239753号に開示したものである。これは各種土壌に広く分布しこれから採取し得られるが、その採取の方法としては、例えば次のような方法を用いる。

すなわち、培養はブチルゴム栓及びアルミシールで密閉したバイアル瓶を用い、30℃にて振とうする。トリクロロエチレン量はヘッドスペ

ースより気相を一定量取り、ガスクロマトグラフィーにより定量し、ヘンリーの法則式より液相濃度を算出する。

前記手段を用い、例えば採取した土壌を1ppmトリクロロエチレン及びメタンの存在下で集積培養を繰り返し、トリクロロエチレンをよく分解する混合微生物系を得る。トリクロロエチレンの分解には酸素及びメタンが必須であることから、混合微生物系からメタノトロフの単離を行う。

本発明において単離された菌は、公知のメチロシナス・トリコスボリウムに属するメチロシナス・トリコスボリウム・TSUKUBAである。

この菌を顕微鏡で観察すると、巾 0.6~1 μm、長さ 1~5 μm の短桿菌で以下の表に示すような特性を有するものである。

Characteristics of methane-utilizing bacterium	
Gram stain	Negative
Cell shape	Short rod
Number of flagella	0
Motility	-
Growth on	
methane	+
ethane	-
propane	-
n-butane	-
dimethylether	-
methylamine	-
methanol	+
ethanol	-
nutrient broth	-
Growth at 30°C	+
37°C	+
45°C	-
Mol% G+C OF DNA	64.5

Major fatty acid	C _{18:1} (96.5%)
Hydroxy fatty acid type	2-OH
Quinone type	Q ₈

以上の菌学的性質に基づき、本発明のメチロシナス菌株の同定を行った。

本発明のメチロシナスの菌株は、菌の形態、グラム染色などの顕微鏡的所見、生理学的諸性質などから、公知菌メチロシナス・トリコスボリウム O B 3b の性状について記載した文献 (1. Journal of General Microbiology 81, 205-218 (1970)、2. Microbial Growth on C₁ Compounds p. 123~133 (1984)、3. Journal of General Applied Microbiology 38, 185~185 (1987)) に記されている Whittenbury ら、及び駒形らの分類に基づき、メチロシナス・トリコスボリウム O B 3b に近縁の株と同定された。

しかしながら、鞭毛を有せず C₁₉ の飽和脂肪酸も有せず、又、ロゼットを形成しない点で、メチロシナス・トリコスボリウム O B 3b とは

明らかに相違し、新菌株と同定され、メチロシナス・トリコスボリウム・TSUKUBA と命名された。

本発明の菌は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第10004号として寄託されている。

本発明の菌はトリクロロエチレン及びその各種類縁化合物、すなわち、シス-1,2-ジクロロエチレン、トランス-1,2-ジクロロエチレン、1,1-ジクロロエチレン、1,1,2,2-テトラクロロエタン、1,1,2-トリクロロエタン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルムを分解する性質を有し、10ppm の高濃度トリクロロエチレンを10日間で約半分に分解する能力を持つ。

本発明においては、上記のメチロシナス・トリコスボリウム・TSUKUBA の反復利用を可能とし、又、反応系からの分離を容易にして、この菌体を工業的に一層有利に利用するため、この菌体を固定化する。

本発明において用いる上記菌体には担体特異

性があり、その固定化のための担体の選択はきわめて重要である。菌体の担体としてはポリウレタン、光硬化性樹脂、高分子電解質なども知られているが、これらの担体は上記の菌体の固定化のためには不適當である。これらを用いて固定化した場合には、上記菌体が本来有するトリクロロエチレン等脂肪族塩素化合物を分解する特性が著しく減殺されてしまう。

本発明者の研究では上記菌体の固定化にはアガースゲル、アルギン酸カルシウムゲル及びκ-カラギーナンゲルを担体として用いた場合だけが、菌体の有用な属性を実質上損うことなく固定化することができる。

本発明の方法を実施するに当っては、本発明の固定化微生物をトリクロロエチレン或いは該化合物を含有する排水或いは排ガス等と溶液状態で接触させることによって行われる。

【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明を更に詳細に説明する。

(固定化菌体の調製法)

バイアル瓶(155ml)に以下の蒸留水に溶解した無機塩培地30mlを入れ、メチロシナス・トリコスポリウム・TSUKUBAを接種した後に1ppmのトリクロロエチレン及びメタンを加えて、ブチルゴム栓、及びアルミシールで完全密封して30℃にて振とう培養を行った。

KH_2PO_4	0.45g/l
K_2HPO_4	1.17g/l
NH_4Cl	2.14g/l
$Ca(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$	4.8mg/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	121mg/l
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	28mg/l
Trace metals	
D. W.	pH 7.2
CH_4	20ml/bottle
又は CH_3OH	0.8ml/bottle

培養液60mlを接種したのち、10mMリン酸緩衝液(pH7.0)2.5mlに懸濁し、4%アルギン酸ソ

で、一定時間振とう培養を行った。

なお、トリクロロエチレンの減少量はヘッドスペース法によりガスクロにて定量した。

まず、各種固定化菌体の1ppmのトリクロロエチレンに対する分解能を比較測定した。その結果を第2図に示す。

縦軸には反応開始時のバイアル瓶内のトリクロロエチレン量を100%とした時の残存率を示している。第2図から明らかなように、ポリウレタン、光硬化性樹脂ではほとんどトリクロロエチレンの減少はみられず、高分子電解質で固定化した場合でも10%程度の減少しかみられない。一方、遊離の休止菌体では14時間後約80%の分解がみられ、又、アガロースゲル、 κ -カラギーナンゲルで固定化した場合においてもほぼ同程度の減少がみられ、アルギン酸カルシウムゲルで固定化した場合には遊離菌よりも分解率がよく、14時間後に90%以上の減少がみられた。

実施例2

ーダ溶液2.5mlを加え5%塩化カルシウム溶液中に滴下してアルギン酸カルシウムゲル固定化菌体を調製した。又、前記菌体懸濁液にそれぞれアガロースあるいは κ -カラギーナンを加え、固定することにより4%アガロース、2% κ -カラギーナンゲル固定化菌体を調製した。又、比較のために光硬化性樹脂(関西ペイント株式会社製ENT-3400)、高分子電解質(PDDA、KPVS)及びウレタンポリマー(東洋ゴム工業株式会社製PU 6)を担体として用いて固定化した。

実施例1

上記で得た固定化菌体を、直径3mmのビーズ又はキューブ状に成形して、前記無機塩培地の入ったバイアル瓶(第1図)1本に入れ、トリクロロエチレンの分解実験を行った。

分解実験では実験結果の解析を容易にするために、生育炭素源は加えずに休止菌体として行った。

なお、固定化休止菌体を賦活化する場合にはメタンあるいはメタノールを前記の量だけ加え

次にトリクロロエチレンの減少が顕著に認められたアガロースゲル、 κ -カラギーナンゲル、及びアルギン酸カルシウムゲルによる固定化菌体について、繰返し使用による分解能の変化とゲルの耐久性について検討を加えた。

ここでは5回の繰返し使用を行った。まずメタンを炭素源としてメチロシナス・トリコスポリウム・TSUKUBAを調製して、固定化し、1回目の実験を行い、その後メタン又はメタノールを加えて賦活化し、再び休止菌体として分解実験を行った。2回目以降も同様に毎回賦活化して分解実験を繰返した。この結果を第1表に示す。表中の数値は分解率をあらわし、1回目の減少量を100%として表わしている。又、ゲルの崩壊については、+が正常なゲル、±はゲルの一部が崩壊したとき、-は完全に崩壊したことを示す。

アルギン酸カルシウムゲルで固定化した場合、第2図においては1回目で遊離菌よりも高い分解能がみられたが、繰返し使うと3回目からゲ

ルの崩壊が始まった。一方、アガロースゲルでは5回の繰返し使用でもゲルの崩壊はみられず、コンスタントな分解能の保持が観察された。κ-カラギーナンゲルでは4回目にゲルが壊れ始めた。又、それぞれの固定化菌体をメタンあるいはメタノールで賦活化した場合、1回目のメタノールでの賦活化ではメタンでの賦活化よりも高い分解率が認められたが、2回目以降では全般的にメタンでの賦活化の方が良くなる傾向が認められた。

第1表

Matrix	Activator	1st	2nd	3rd	4th	5th
Free	Methane	100	89	59	59	59
	Methanol		71	31	28	20
Alginate	Methane	100(+)	58 (±)	61 (±)	(-)	
	Methanol		58 (+)	31 (±)	(-)	
Agarose	Methane	100(+)	42 (+)	39 (+)	40 (+)	43 (+)
	Methanol		77 (+)	58 (+)	33 (+)	35 (+)
k-Carrageenan	Methane	100(+)	33 (+)	27 (+)	12 (±)	(-)
	Methanol		61 (+)	21 (+)	14 (±)	(-)

実施例3

次にアガロース固定化休止菌体が分解し得る

そこでLineveaver-Burkの方法により、最大分解速度 V_{max} と飽和定数 K_m を求めてみた。

第5図はLineveaver-Burkのプロットである。

これから V_{max} と k_m を求めると、固定化菌体の V_{max} は $3.15 \mu\text{g TCE}/\mu\text{g cell/hr}$ で、遊離菌体では2.62と求められ、一方 k_m は固定化菌体では $100 \mu\text{M}$ 、遊離菌体で $86 \mu\text{M}$ であった。これらの数値より、固定化しても遊離菌と比べて分解能が顕著に低下することは認められず、 V_{max} は固定化した方が若干高くなる傾向がある。又、 k_m は固定化菌体の方が大きく、基質であるトリクロロエチレンとの親和力が弱いことがわかる。基質との親和力が弱いのは固定化担体であるアガロースゲルが菌体への基質の拡散を阻害しているためだと考えられ、特に高濃度トリクロロエチレンの場合にはゲルが菌体を保護し有効であると思われる。

ついで分解速度の温度による影響について検討を行った。その結果を第6図に示す。縦軸の分解速度は0.10から示してある。

トリクロロエチレン濃度の上限を検討した。第3図において縦軸はバイアル瓶内の初発トリクロロエチレン量を100%としてその相対的な残存率をあらわしている。

第3図から、液相濃度が100ppmではトリクロロエチレンの減少は全くみられないが、85ppm以下の濃度ではそれぞれ減少がみられ、かなり高い濃度でも分解されることが明らかである。ここには示していないが、遊離菌においてもほぼ同様の結果が得られた。次にここで得られた結果をもとに、各濃度における分解速度を求め、トリクロロエチレン濃度との関係を調べてみた。

第4図は基質であるトリクロロエチレンの濃度とその分解速度との関係を表した図である。縦軸には分解速度、横軸にはトリクロロエチレンの濃度を示している。上が固定化菌体、下が遊離の菌体の場合である。

この図からも明らかなようにアガロースに固定化した場合のトリクロロエチレンの分解パターンはMichaelis-Menten型であることがわかる。

15℃と35℃では分解速度は急激に低下しているが、20℃で最も高い分解速度を示した。又、20℃から30℃にかけても比較的安定であることがわかった。

第7図は、分解速度に対するpHの影響について検討した結果である。pH 6から7.5の広い範囲において分解速度はほとんど一定であるがpH 8では急激に分解速度が低下していることがわかる。又、pH 6で分解速度が若干大きくなったことについては、酸性溶液のためにアガロースゲルの強度が弱くなり、菌体が多少漏れ出し、そのため遊離菌によるトリクロロエチレンの分解が進んだためと考えられる。したがって、この固定化菌体ではアルカリ側では分解活性は低下するが、中性ではそれほど大きな活性の変化はないといえる。

【発明の効果】

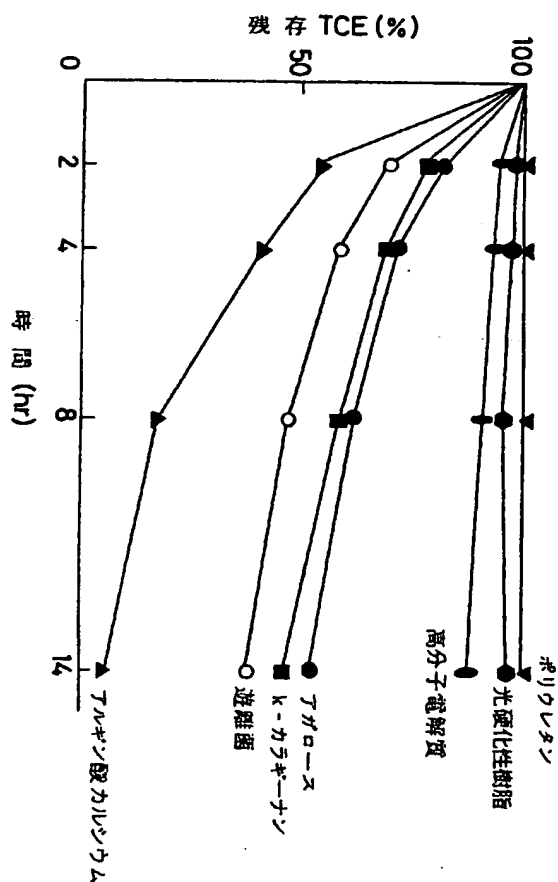
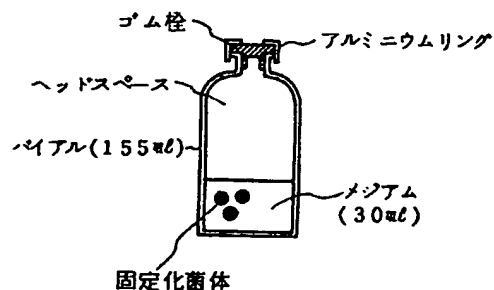
以上説明したように、本発明により特定の担体を選択することによりメチロシナス・トリコスポリウム・TSUKUBAが有する脂肪族塩素化合

物の分解特性を実質上低下させることなく固定化することができ、この新規固定化微生物を使用することにより、難分解性の汚染物質を効率的に分解することができる。

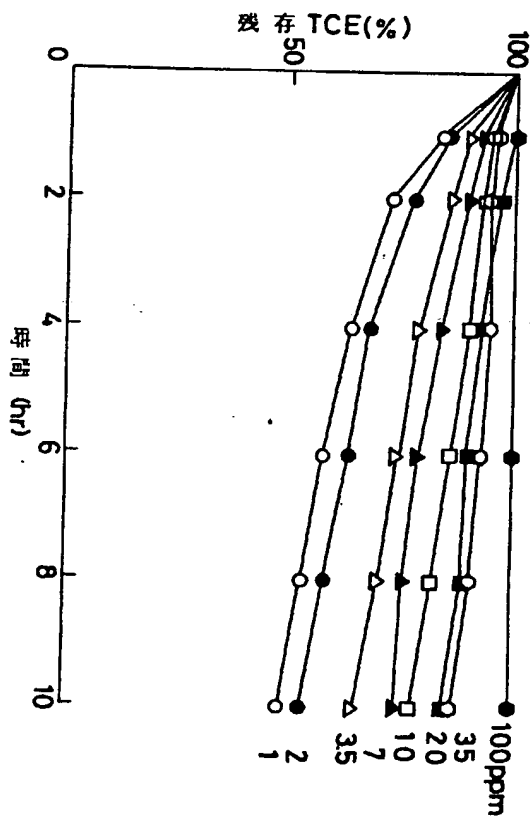
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明実施例に供した試験装置の説明図、第2図は各種担体に固定化した場合のトリクロロエチレンの分解特性を説明する図、第3図はアガロースに固定した菌体によるトリクロロエチレン分解特性のその濃度による変化を説明する図、第4図は同菌体のトリクロロエチレンの分解速度に及ぼすその濃度の影響について説明する図、第5図は同菌体によるトリクロロエチレン分解のLineveaver-Burkプロットを表わす図、第6図は同菌体によるトリクロロエチレン分解特性に及ぼす温度の影響を説明する図、第7図は同菌体によるトリクロロエチレン分解特性に及ぼすpHの影響を説明する図。

第1図

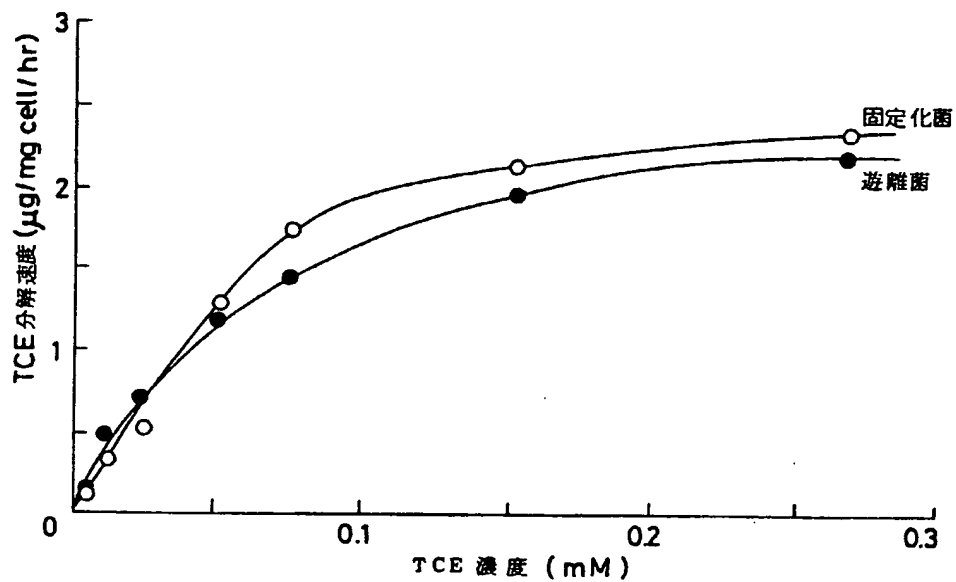


第2図

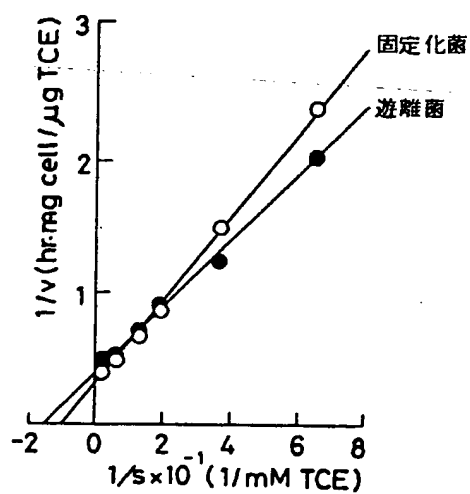


第3図

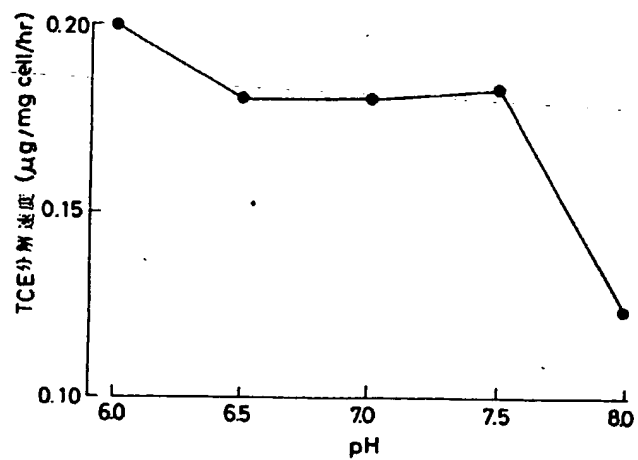
第 4 図



第 5 図



第 7 図



第 6 図

